

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

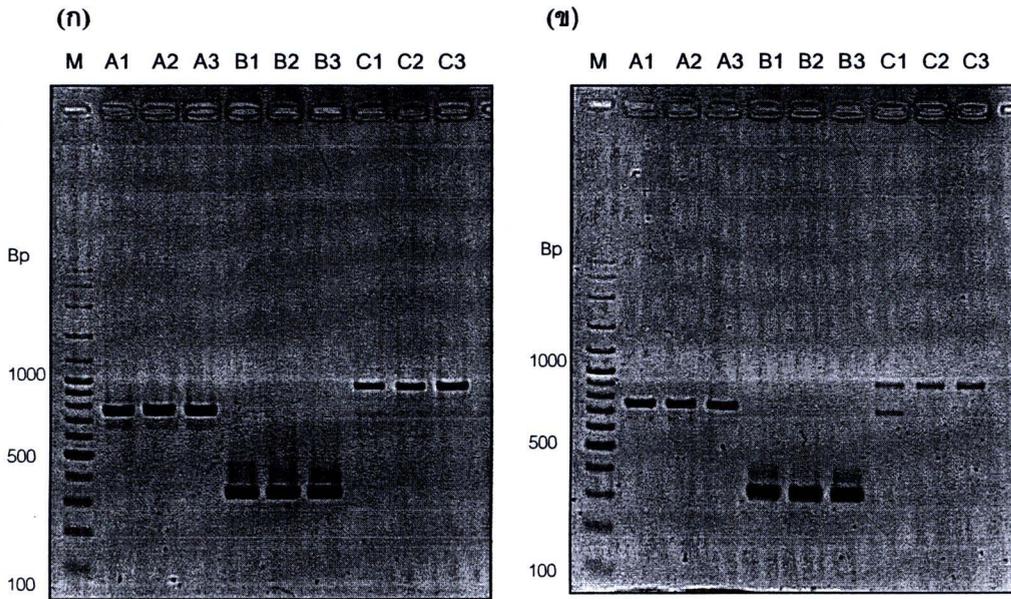
#### 4.1 การเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตดินในเนื้อเยื่อของโค

##### 4.1.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตดิน

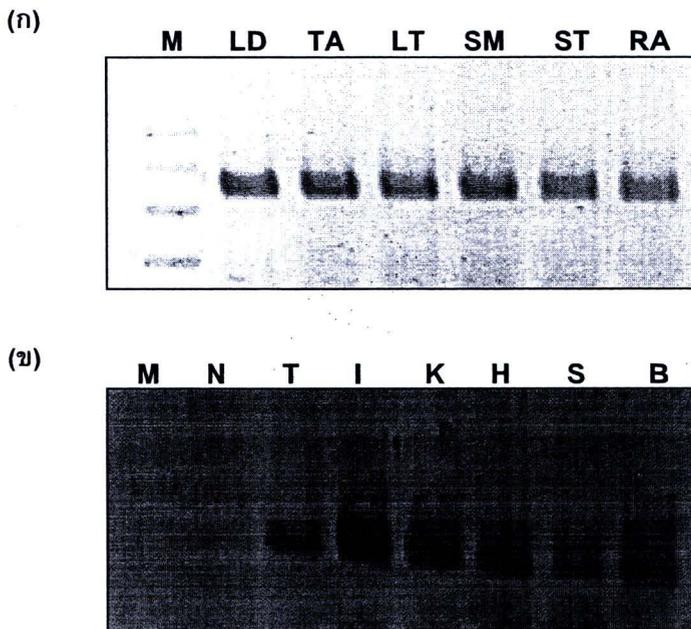
เมื่อทำการเปรียบเทียบเส้นยีนคาลปาสเตดินทั้งสี่ชนิด (CASTI-IV) ของโคยุโรปสายพันธุ์ชาโรเลส์ที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank หมายเลขยีน NM\_001030318, NM\_174003, NM\_001030319 และ NM\_001030320 ตามลำดับ พบว่าส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนของยีน CASTI และ CASTII มีความยาวใกล้เคียงกันคือประมาณ 2,400 นิวคลีโอไทด์ ขณะที่ CASTIII และ CASTIV มีขนาดประมาณ 2,100 และ 1,300 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ยีนคาลปาสเตดินทั้งสี่ชนิดมีความแตกต่างกันในส่วนปลายด้าน 5' ส่วนปลายด้าน 3' มีลำดับอนุรักษ์มากกว่า 95% จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีนคาลปาสเตดินโดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 7 ชุด ตามที่แสดงในหัวข้อ 3.4.3 ซึ่งครอบคลุมยีนคาลปาสเตดินทั้ง 4 ชนิด

เมื่อนำตัวอย่างกล้ามเนื้อของโคมาทำการสกัดอาร์เอ็นเอ พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นประมาณ 300-1,200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ทำการจำแนกยีนคาลปาสเตดินต่อไปโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบย้อนกลับ โดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆทั้ง 7 ชุด เมื่อนำผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปแยกบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1% ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า ไพรเมอร์คู่ CONS-F1/CONS-R1, CONS-F2/CONS-R2 และ CAST-5F/CAST-R1-4 ให้ผลบวกในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่อุณหภูมิในการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) ตั้งแต่อุณหภูมิ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.1) โดยไพรเมอร์คู่ CONS-F2/CONS-R2 ให้ความเข้มข้นของแบนด์มากที่สุดและมีความจำเพาะต่อยีนคาลปาสเตดิน จึงเลือกไพรเมอร์คู่นี้มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยีนคาลปาสเตดินด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณยีนในสภาพจริงต่อไป โดยในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะเลือกใช้อุณหภูมิในการเข้าจับของไพรเมอร์ของยีนคาลปาสเตดินที่ 55 องศาเซลเซียส เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิเดียวกันกับการปฏิกิริยาของไพรเมอร์ของยีนเบต้าแอกตินซึ่งใช้เป็นยีนควบคุมในการทดลองครั้งนี้

เมื่อทดสอบการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตดินด้วยไพรเมอร์คู่ CONS-F2/CONS-R2 โดยใช้ อาร์เอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากกล้ามเนื้อลายชนิด Rectus abdominis (RA), Semitendinosus (ST), Semimembranosus (SM), Transversus abdominis (TA), Longissimus trorcis (LT) และ Longissimus dorsi (LD) และในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ สมอง (B) หัวใจ (H) ตับ (L) ไต (K) ม้าม (S) ลำไส้ (I) และ อัณฑะ (T) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตดินได้อย่างจำเพาะในเนื้อเยื่อทุกชนิดที่ทำการทดสอบ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 ผลการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตดอินโนโคพีนเมือง (ก) และโคก้าแพงแสน (ข) แถบ M แสดง ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder อักษร A B และ C แทนผลผลิตพีซีอาร์ของไพรเมอร์ CONS-F1/CONS-R1, CONS-F2/CONS-R2 และ CAST-5F/CAST-R1-4 ตามลำดับ ส่วนหมายเลขแทนอุณหภูมิช่วงการ annealing ที่ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 ผลการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตดอินโนโคพีนเมืองในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลาย (ก) และ อวัยวะ (ข) ของโคพีนเมือง โดยแถบ M แสดง ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder แถบ N แทน negative control แถบ LD, TA, LT, SM, ST และ RA แทนกล้ามเนื้อชนิด Longissimus Dorsi, Transversus Abdominis, Longissimus Troracis, Semi Membranosus, Semi Tendinosus และ Rectus Abdominis ตามลำดับ แถบ T, I, K, H, S และ B แทนเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ ได้แก่ อัณฑะ ลำไส้ ไต หัวใจ ม้าม และ สมอง ตามลำดับ

## 4.2 รหัสพันธุกรรมของยีนคาลปาสเตตินในโค

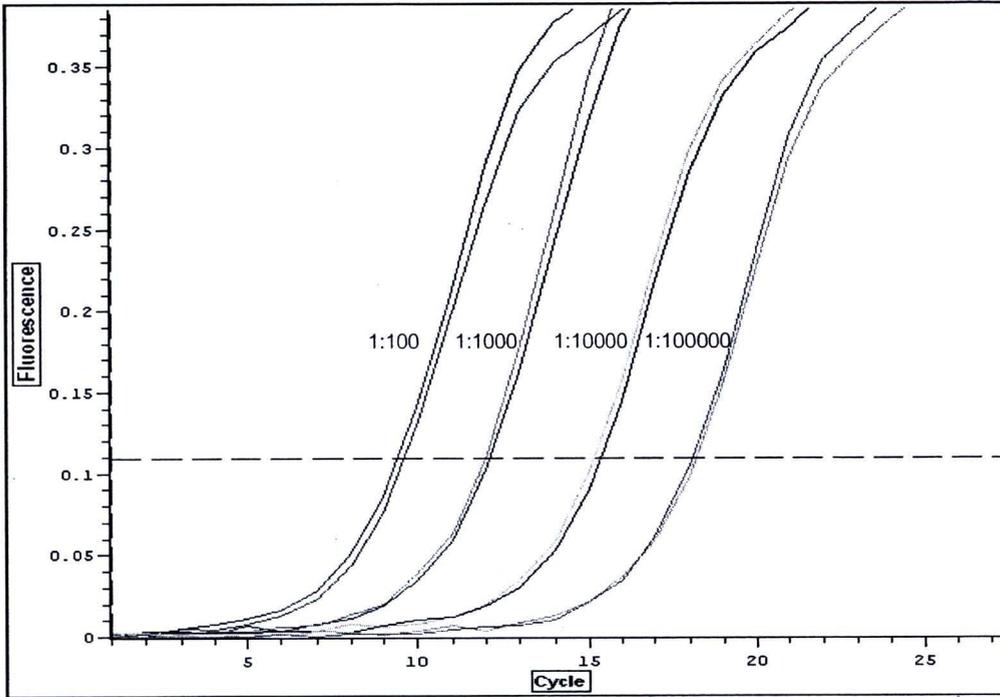
เมื่อทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากกล้ามเนื้อลายชนิด *Longissimus dorsi* ของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน และเพิ่มจำนวนยีนคาลปาสเตตินด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์แบบย้อนกลับ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์และทำการรวมเส้นยีน พบว่า ชั้นยีนคาลปาสเตตินจากโคที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มีความยาว 1,325 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับยีนคาลปาสเตตินจากโคสายพันธุ์ซาร์โรเลสส์ ชนิดที่ I, II, III และ IV ตามหมายเลขยีน NM\_001030318, NM\_174003, NM\_001030319 และ NM\_001030320 ตามลำดับ โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่า ชั้นยีนคาลปาสเตตินที่จำแนกได้จากโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสนมีความเหมือนกับยีนคาลปาสเตตินในโคสายพันธุ์ซาร์โรเลสส์ถึง 98-99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก)

## 4.3 การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในโค

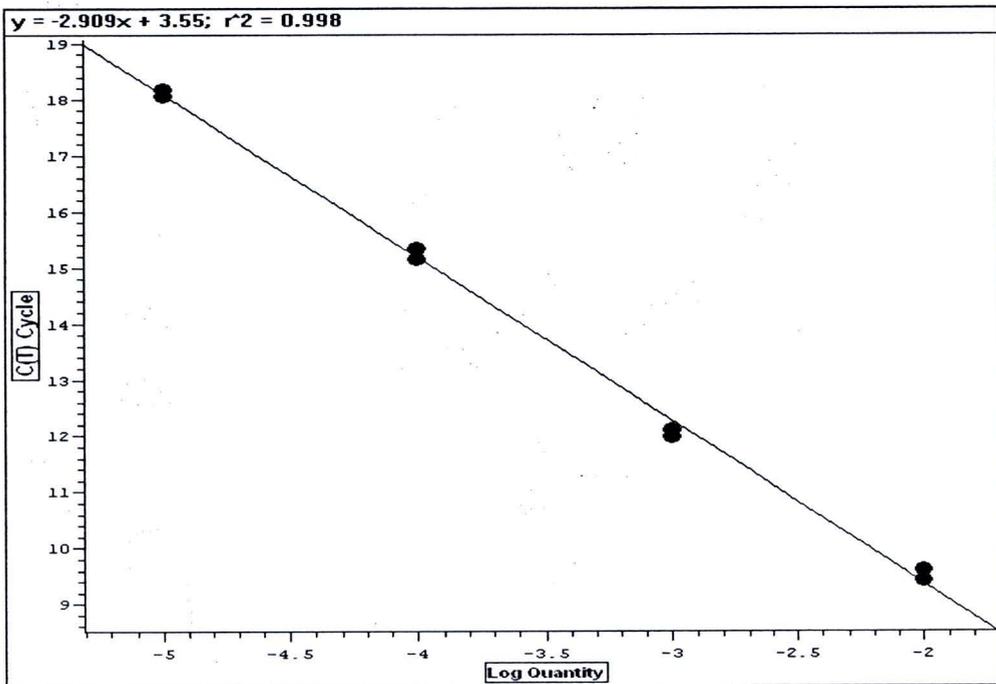
เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อและอวัยวะของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาพจริง (Real-Time RT-PCR) ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

### 4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณยีน

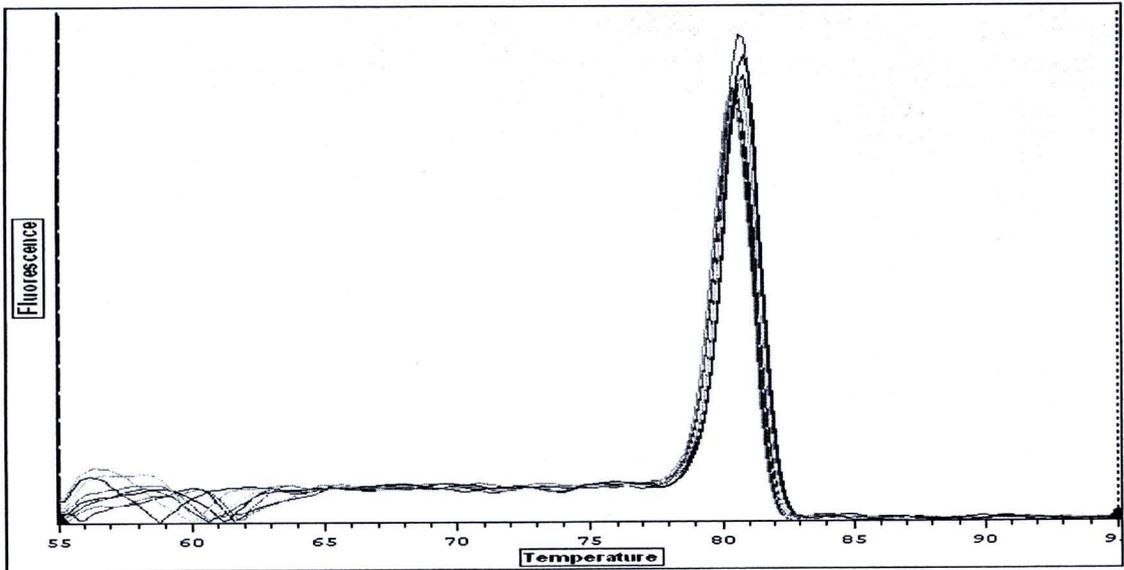
การทดสอบประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน (PCR efficiency) โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาพจริง ใช้ยีนคาลปาสเตตินเจือจางในสัดส่วน 1:100 ถึง 1:100000 ทำการทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ชุด CONS2F/CONS2R ผลการทดสอบพบว่า ค่าความลาดชันของกราฟ (slope) ระหว่างค่า cycle threshold (CT) และ ค่า log quantity เท่ากับ 2.909 โดยมีค่า  $r^2$  เท่ากับ 0.998 (ภาพที่ 4.3 และภาพที่ 4.4) นอกจากนี้ยังพบว่าค่าประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน (Efficiency of amplification: E) โดยเฉลี่ยเท่ากับ  $1.61 \pm 0.07$  (ภาคผนวก ค) ซึ่งอยู่ในช่วงค่า E จะอยู่ระหว่าง 1.6 ถึง 2.0 ที่ยอมรับได้ตามรายงานของ Souza *et.al.* (1996) และเมื่อวิเคราะห์ melting curve พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตตินมีค่า melting temperature ( $T_m$ ) เท่ากับ  $80.6 \pm 0.17$  °C (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงผลการวัดค่าการเรืองแสงระหว่างรอบของการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน เมื่อเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบที่สัดส่วน 1:100 – 1:100000



ภาพที่ 4.4 กราฟระหว่างค่า cycle threshold (CT) และ ค่า log quantityของการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน เมื่อเจือจางดีเอ็นเอต้นแบบที่สัดส่วน 1:100 – 1:100000



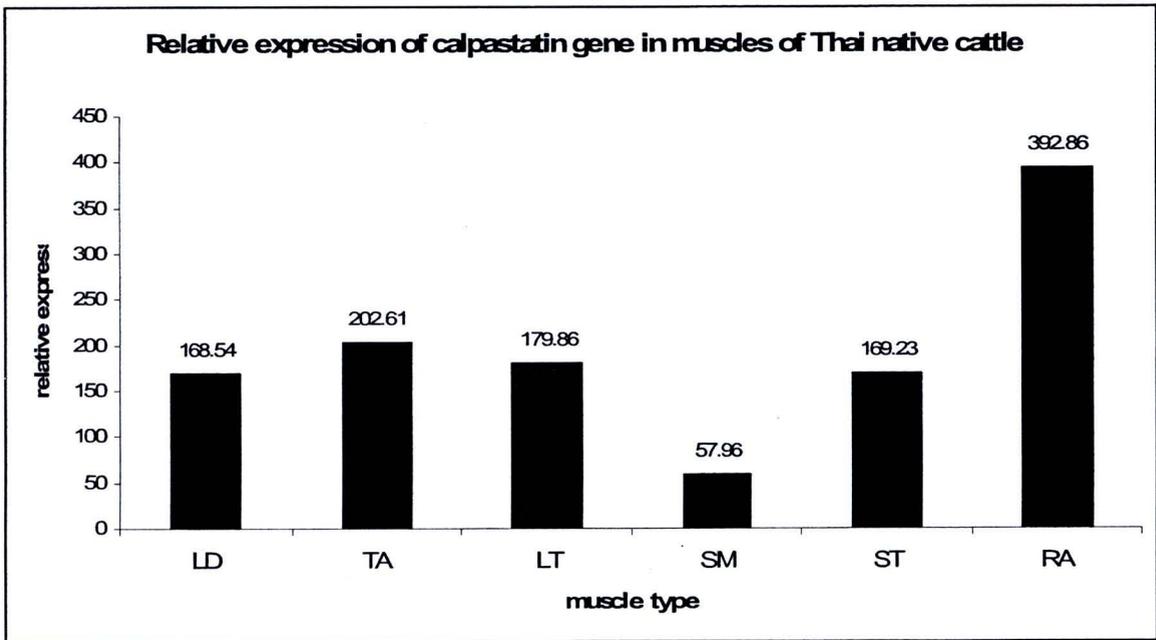
ภาพที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิตพีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตติน

#### 4.3.2 การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง

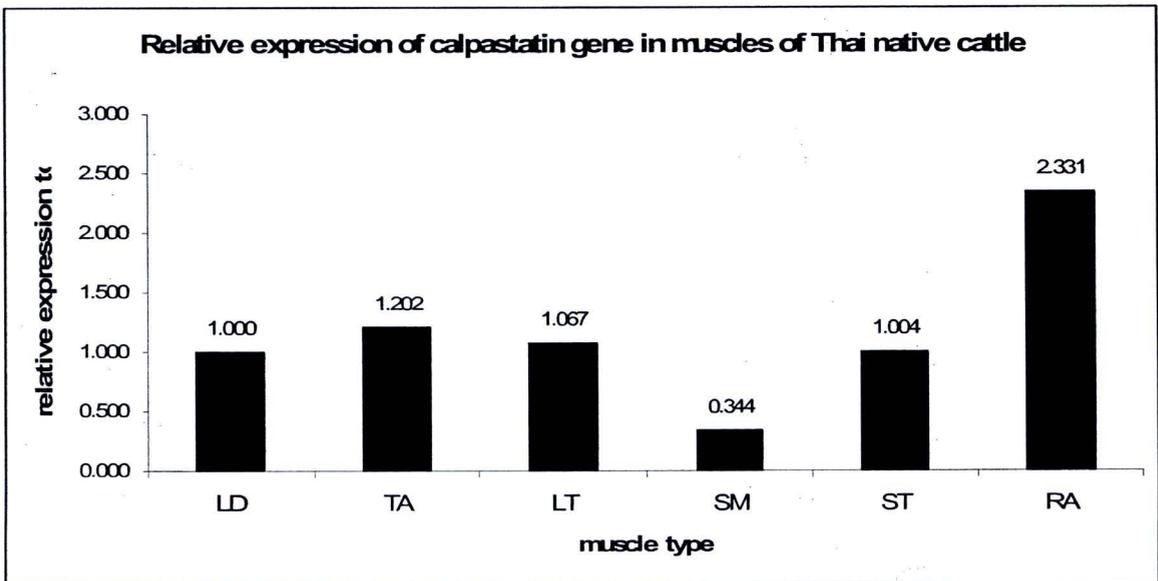
เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตตินด้วยไพรเมอร์คู่ CONS-F2/CONS-R2 โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณยีนในสภาพจริง (realtime-PCR) โดยใช้อาร์เอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อลายของโคพื้นเมือง ได้แก่ Rectus abdominis (RA), Semitendinosus (ST), Semimembranosus (SM), Transversus abdominis (TA), Longissimus trorcis (LT) และ Longissimus dorsi (LD) และใช้ยีนเบต้าแอกตินเป็นยีนควบคุม โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์พบว่า การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินมีค่ามากที่สุดที่กล้ามเนื้อชนิด RA โดยมีค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  เท่ากับ 392.86 รองลงมาเป็นกล้ามเนื้อชนิด TA ซึ่งค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  เท่ากับ 202.61 ขณะที่กล้ามเนื้อชนิด ST, LT และ LD มีค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  ใกล้เคียงกันประมาณ 170-180 นอกจากนี้ยังพบว่ากล้ามเนื้อชนิด SM มีการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินน้อยที่สุด โดยมีค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  เท่ากับ 57.96 (ภาพที่ 4.6ก)

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อชนิดต่างๆเทียบกับในกล้ามเนื้อสันนอก LD พบว่า การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อชนิด RA มีค่าเป็น 2.331 เท่าของกล้ามเนื้อ LD ขณะที่การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อชนิด LD, LT, TA และ ST มีปริมาณใกล้เคียงกัน และพบว่ากล้ามเนื้อชนิด SM มีการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินเพียง 1 ใน 3 หรือ 0.344 เท่าของกล้ามเนื้อ LD เท่านั้น (ภาพที่ 4.6ข)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.6 ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมืองชนิด Longissimus dorsi (LD), Rectus abdominis (RA), Longissimus troricis (LT), Semimembranosus (SM), Semitendinosus (ST) และ Transversus abdominis (TA) แสดงผลเป็นค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  (ก) และ แสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีนเมื่อเทียบกับกล้ามเนื้อ LD (ข)

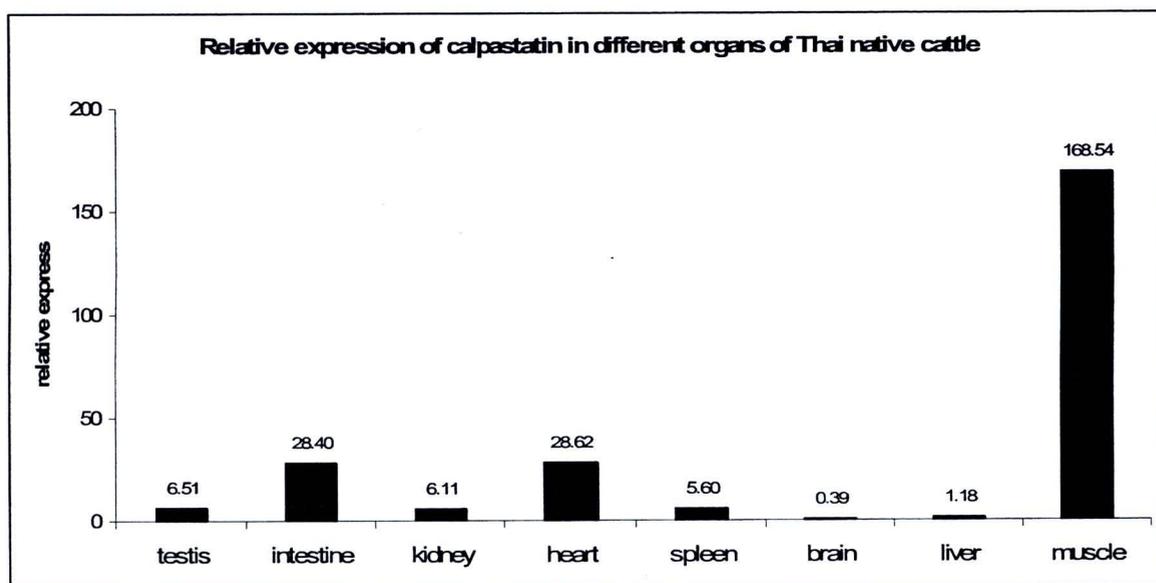
### 4.3.3 การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคพื้นเมือง

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนคาลปาสเตตินด้วยไพรมเมอร์คู่ CONS-F2/CONS-R2 โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณยีนในสภาพจริง (realtime-PCR) โดยใช้อาร์เอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆของโคพื้นเมือง ได้แก่ สมอง หัวใจ ตับ ไต ม้าม ลำไส้ และ อัณฑะ และใช้ยีนเบต้าแอกตินเป็นยีนควบคุม โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในลำไส้และหัวใจมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  ประมาณ 28.50 ขณะที่ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอัณฑะ ไต และ ม้าม มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 5.60-6.50 และ ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในตับและสมองมีค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  เพียง 1.18 และ 0.39 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7ก)

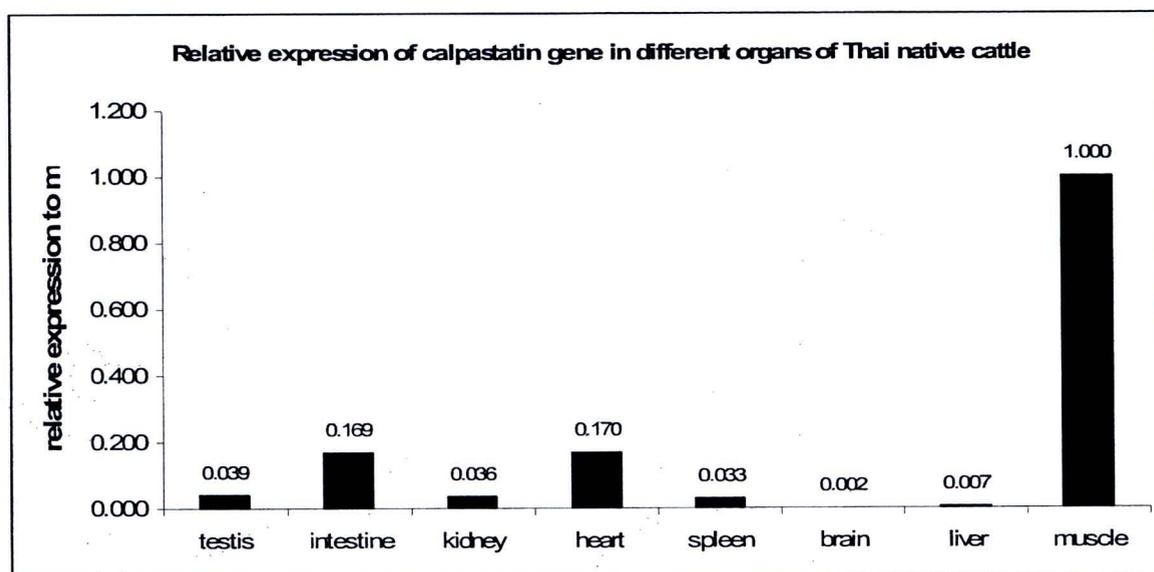
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอวัยวะต่างๆของโคพื้นเมืองเทียบกับในกล้ามเนื้อลายชนิด LD พบว่า ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในลำไส้และหัวใจมีค่าเป็น 0.17 เท่าของกล้ามเนื้อ LD การแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอัณฑะ ไต และ ม้าม มีปริมาณใกล้เคียงกันมีค่าเป็น 0.03-0.04 เท่าของกล้ามเนื้อ LD ขณะที่ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในสมองและตับมีค่าเพียง 0.002 และ 0.007 เท่าของปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อ LD เท่านั้น (ภาพที่ 4.7ข)



(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.7 ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคพื้นเมือง ได้แก่ อัณฑะ ลำไส้ ไต หัวใจ ม้าม สมอ ตับ และ กล้ามเนื้อลายชนิด Longissimus dorsi แสดงผลเป็นค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  (ก) และ แสดงสัดส่วนการแสดงออกของยีนเมื่อเทียบกับกล้ามเนื้อ (ข)

## 4.4 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในโค

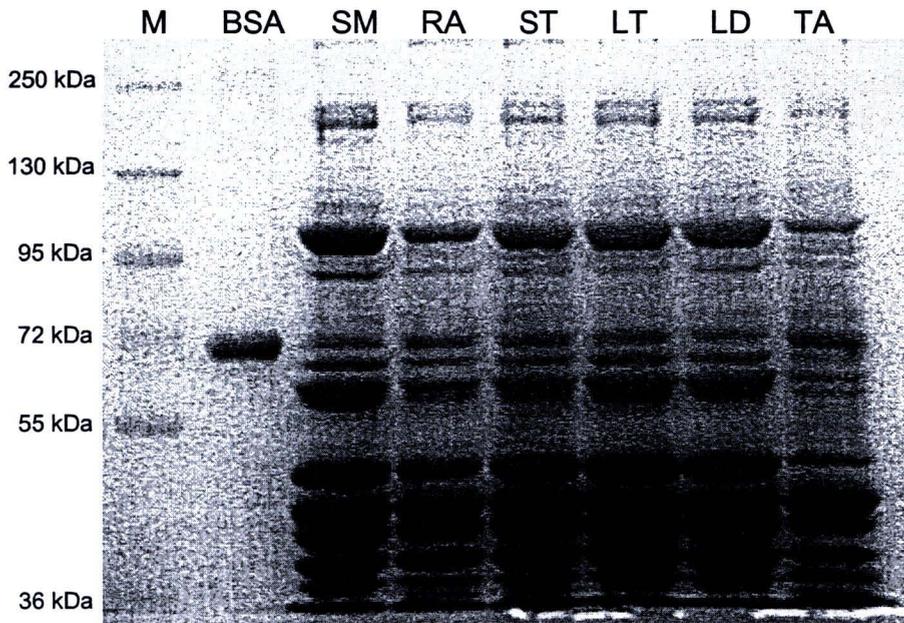
### 4.4.1 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อโคพื้นเมือง

หลังจากทำการแยกโปรตีนที่สกัดจากกล้ามเนื้อลายของโคพื้นเมืองบนเจลอะคริลาไมด์ด้วย กระจกไฟฟ้า (SDS-PAGE) แล้วนำมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโดเมนที่ IV (ภาพที่ 4.8) พบว่า สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 70 และ 145 kDa มีการแสดงออกในปริมาณมากในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ได้แก่ Rectus abdominis (RA), Semitendinosus (ST), Semimembranosus (SM), Transversus abdominis (TA), Longissimus troracis (LT) และ Longissimus dorsi (LD) โดยที่การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อลายชนิด RA และ ST ปรากฏแถบโปรตีนมีความเข้มมากที่สุด กล้ามเนื้อลายชนิด TA, LT และ LD ปรากฏแถบโปรตีนมีความเข้มรองลงมา และกล้ามเนื้อชนิด SM พบมีปริมาณโปรตีนคาลปาสเตตินน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนที่มีความเข้มเล็กน้อยที่ขนาด 170, 110, 90, 60, 45 และ 40 kDa ในตัวอย่างกล้ามเนื้อลายทุกชนิดที่ทำการทดสอบอีกด้วย

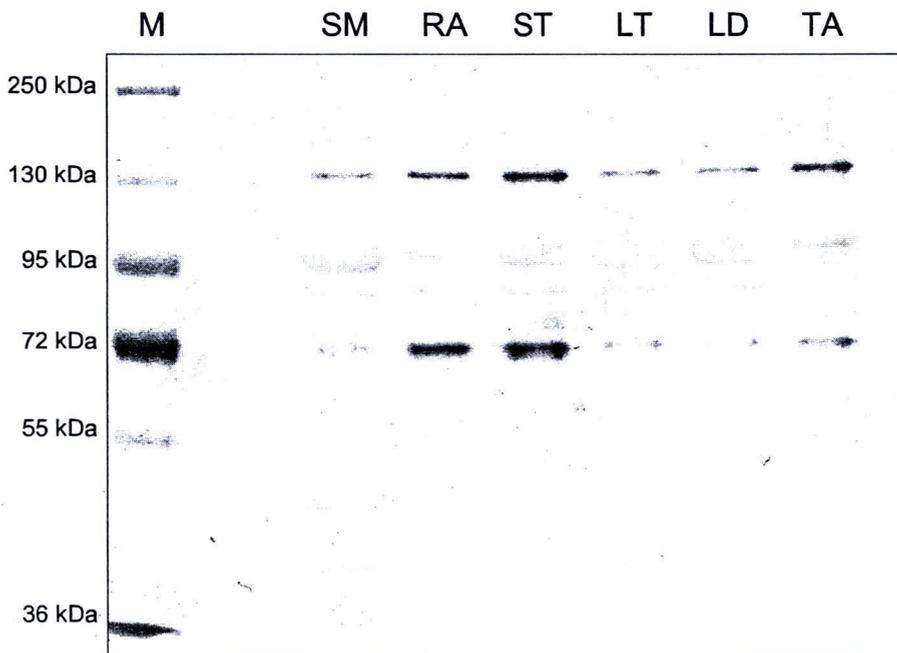
### 4.4.2 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคพื้นเมือง

หลังจากทำการแยกโปรตีนที่สกัดจากเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆของโคพื้นเมืองบนเจลอะคริลาไมด์ด้วยกระจกไฟฟ้า (SDS-PAGE) แล้วนำมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโดเมนที่ IV (ภาพที่ 4.9) พบว่า สามารถตรวจพบปริมาณคาลปาสเตตินมีความเข้มมากที่สุด ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากหัวใจ ขณะที่ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากไต ม้าม และ สมอง พบปริมาณโปรตีนคาลปาสเตตินเพียงเล็กน้อย ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากหัวใจพบไอโซฟอร์มขนาด 95, 125, 135 และ 145 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 135 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุด ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากไตพบไอโซฟอร์มเพียง 2 ขนาด คือ 125 และ 145 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าไอโซฟอร์มขนาด 125 kDa ประมาณ 2 เท่า ในเนื้อเยื่อจากม้ามพบไอโซฟอร์ม 2 ขนาด คือ 125 และ 135 kDa ในปริมาณการแสดงออกที่เท่าๆกัน ขณะที่ในเนื้อเยื่อจากสมองและตับ สามารถตรวจพบไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa เพียงขนาดเดียว โดยมีปริมาณการแสดงออกเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่อจากอวัยวะและลำไส้

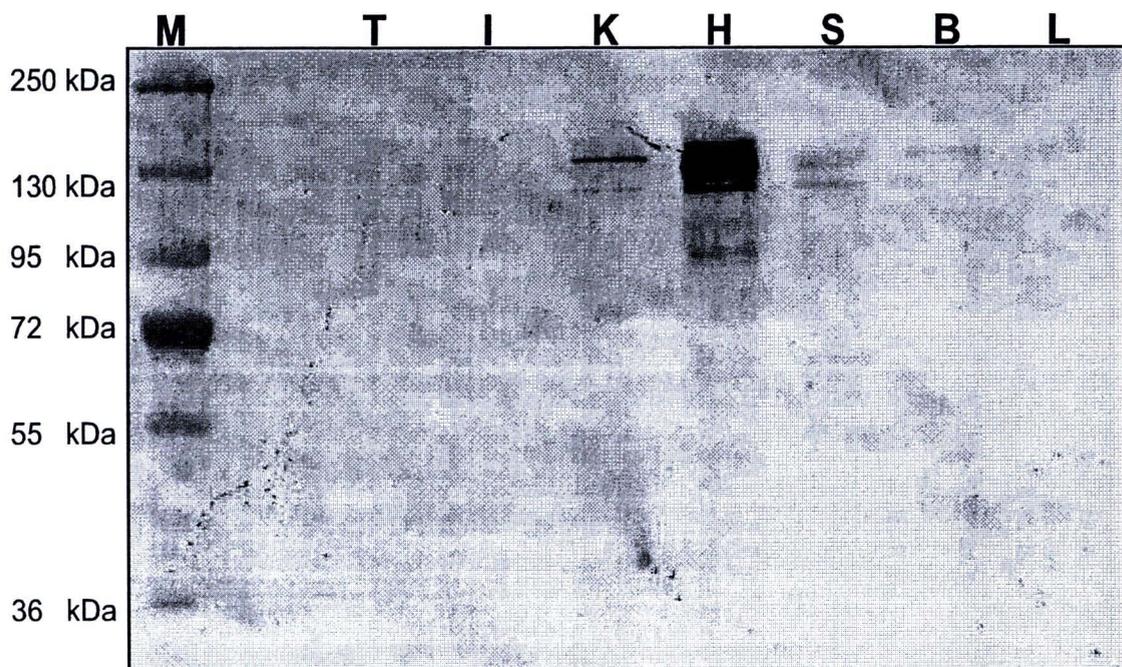
(ก)



(ข)



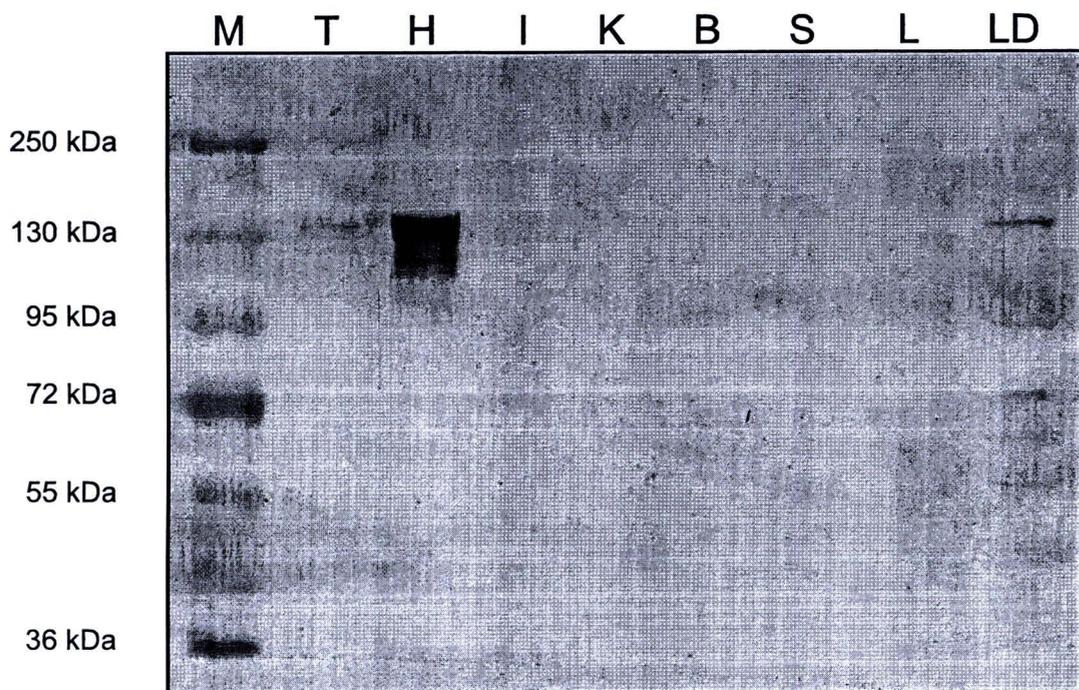
ภาพที่ 4.8 เจล SDS-PAGE (ก) และ Western blot (ข) ของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อของโคพื้นเมือง โดยแถบ M แทน molecular weight marker แถบ BSA แทน bovine serum albumin แถบ SM, RA, ST, LT, LD TA แทนกล้ามเนื้อชนิด Semimembranosum, Rectus abdominis, Semitendinosus, Longissimus trorcis, Longissimus dorsi และ Transversus abdominis ตามลำดับ



ภาพที่ 4.9 Western blot ของโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่ออวัยวะของโคพื้นเมือง โดยแถบ M แทน molecular weight marker แถบ T, I, K, H, S, B และ L แทน อวัยวะ ลำไส้ ไต หัวใจ ม้าม สมอง และ ตับ ตามลำดับ

#### 4.4.3 การแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินในอวัยวะของโคกำแพงแสน

หลังจากทำการแยกโปรตีนที่สกัดจากเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆของโคกำแพงแสนบน เจลอะครีลาไมด์ด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) แล้วนำมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนคาลปาสเตตินด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโดเมนที่ IV (ภาพที่ 4.10) พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณคาลปาสเตตินมีความเข้มข้นมากที่สุดในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากหัวใจ โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 135-145 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนในปริมาณมาก ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะพบไอโซฟอร์มขนาด 125 และ 145 kDa โดยที่ไอโซฟอร์มขนาด 145 kDa มีความเข้มของแถบโปรตีนมากกว่าไอโซฟอร์มขนาด 125 kDa ประมาณ 2 เท่า ในกล้ามเนื้อสันนอกพบไอโซฟอร์ม 4 ขนาด คือ 40, 72, 95 และ 145 kDa เช่นเดียวกับในโคพื้นเมือง โดยไอโซฟอร์ม 72 และ 145 kDa มีปริมาณการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน ขณะที่ในเนื้อเยื่อจากลำไส้ ไต สมอง ม้าม และตับ ไม่สามารถตรวจพบแถบโปรตีนคาลปาสเตตินได้



ภาพที่ 4.10 Western blot ของโปรตีนคาลปาสเตตินในเนื้อเยื่ออวัยวะของโคก้าแพงแสน โดยแถบ M แทน molecular weight marker แถบ T, H, I, K, B, S, L และ LD แทน อวัยวะ หัวใจ ลำไส้ ไต สมอง ม้าม ตับ และ กล้ามเนื้อสันนอก ตามลำดับ

#### 4.5 ความสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโค

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตติน เฉพาะในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมือง โดยเปรียบเทียบกับโคก้าแพงแสนซึ่งเป็นโคลูกผสมสายเลือดชาโรเลสส์ 50% บราห์มัน 25% และ โคพื้นเมืองไทย 25% โดยใช้ตัวอย่างสายพันธุ์ละ 15 ตัวอย่าง บมที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 24 ชั่วโมงหลังฆ่า ทำการประเมินความสัมพันธ์ของการแสดงออกและการทำงานของยีนคาลปาสเตตินต่อความนุ่มของเนื้อ และประเมินผลกระทบของสายเลือดโคต่อการวิเคราะห์ดังกล่าว

##### 4.5.1 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler shear force) ของกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคก้าแพงแสนตามวิธีของ Boccard *et al.* (1981) โดยเนื้อแต่ละตัวอย่างทำการวัดค่าซ้ำ 10 ครั้ง ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อของกล้ามเนื้อสันนอกโคพื้นเมืองมีค่าเท่ากับ  $15.34 \pm 3.12$  กก.ต่อตร.ซม. ขณะที่ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของกล้ามเนื้อสันนอกโคก้าแพงแสนมีค่าเท่ากับ  $10.80 \pm 1.62$  กก.ต่อตร.ซม. มีความแตกต่างกันด้วยค่า  $p$  value  $< 0.0001$  (ตารางที่ 4.1)

แสดงว่ากล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสนมีความนุ่มมากกว่ากล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ตารางที่ 4.1 ค่าแรงตัดผ่านกล้ามเนื้อสันนอกของโค

สายพันธุ์โค	จำนวนตัวอย่าง	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ <sup>n</sup> (กก. ต่อ ตร.ซม.)
โคพื้นเมือง	15	15.34±3.12
โคกำแพงแสน	15	10.80±1.62
ค่า p value		<0.0001

<sup>n</sup>เนื้อผ่านการบ่มหลังการฆ่าที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

#### 4.5.2 ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตติน

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสน ด้วยการเพิ่มปริมาณยีนในสภาพจริง (realtime-PCR) โดยใช้ยีนเบต้าแอกตินเป็นยีนควบคุม และวิเคราะห์ค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  ผลการวิเคราะห์พบว่า ค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  ของกล้ามเนื้อสันนอกโคพื้นเมืองเท่ากับ  $168.54 \pm 48.79$  ขณะที่ค่า  $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$  ของกล้ามเนื้อสันนอกโคกำแพงแสนเท่ากับ  $108.21 \pm 33.52$  มีความแตกต่างกันด้วยค่า p value = 0.0005 (ตารางที่ 4.2) แสดงว่าปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมีมากกว่าในกล้ามเนื้อสันนอกของโคกำแพงแสนอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

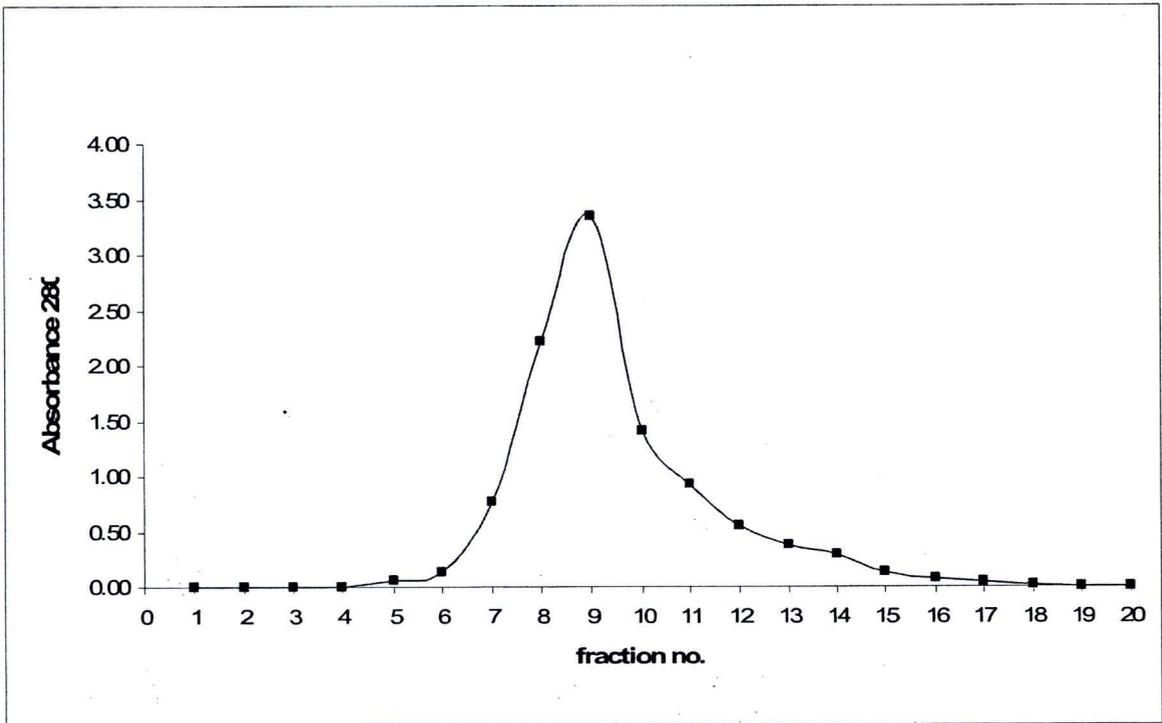
ตารางที่ 4.2 ปริมาณการแสดงออกของยีนในกล้ามเนื้อสันนอกของโค

สายพันธุ์โค	จำนวนตัวอย่าง	ค่า $E^{\Delta CP(\text{actin-cast})}$
โคพื้นเมือง	15	168.54 ± 48.79
โคกำแพงแสน	15	108.21 ± 33.52
ค่า p value		0.0005

#### 4.5.3 ค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตติน

ทำการสกัดโปรตีนแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ที่บรรจุ DEAE-Sephacel<sup>TM</sup> ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากรายงานของ Geesink and Koohmaraie (1999) และชะเอาโปรตีนคาลปาสเตตินออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 200 mM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่ชะ

ออกจากคอลัมน์ fraction ละ 1 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละ fraction (ภาคผนวก ค) นำมาสร้างกราฟ พบว่าปรากฏโปรตีนเริ่มชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 5 และพบโปรตีนมีความเข้มข้นมากที่สุดใน fraction ที่ 9 ความเข้มข้นของโปรตีนค่อยๆลดลงจนชะออกหมดใน fraction ที่ 17 (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel™ วัดที่ความยาวคลื่น 280 nm โดยแต่ละ fraction มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เมื่อทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองและโคกำแพงแสนในตัวอย่างโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel™ ผลการวิเคราะห์พบว่า ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินของกล้ามเนื้อสันนอกโคพื้นเมืองเท่ากับ  $24.70 \pm 1.22$  หน่วยต่อกรัมของเนื้อ ขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินของกล้ามเนื้อสันนอกโคกำแพงแสนเท่ากับ  $23.46 \pm 2.40$  หน่วยต่อกรัมของเนื้อ โดยมีค่า p value = 0.1225 (ตารางที่ 4.3) แสดงว่าค่ากิจกรรมการทำงานของคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองแลโคกำแพงแสนไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ

ตารางที่ 4.3 ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโค

สายพันธุ์โค	จำนวนตัวอย่าง	ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตติน (หน่วยต่อกรัมของเนื้อ)
โคพื้นเมือง	10	24.70 ± 1.22
โคกำแพงแสน	13	23.46 ± 2.40
ค่า p value		0.1225

#### 4.5.4 ค่าสหสัมพันธ์ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมือง

เมื่อนำค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และ ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองไทยมาวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์โดยใช้ Pearson Correlation พบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงว่าถ้าค่าแรงตัดผ่านมีค่ามากปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินก็มากด้วย ขณะที่ทั้งค่าแรงตัดผ่านเนื้อและปริมาณการแสดงออกของยีนคาลปาสเตตินไม่มีความสัมพันธ์กับค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตติน

ตารางที่ 4.4 ค่าสหสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคพื้นเมืองไทย

	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	ปริมาณการ แสดงออกของยีน	การทำงานของเอนไซม์
ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	1.00000	0.73633**	-0.28037
ปริมาณการ แสดงออกของยีน		1.00000	-0.35621
การทำงานของเอนไซม์			1.00000

\*\* = มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

#### 4.5.5 ค่าสหสัมพันธ์ในกล้ามเนื้อสันนอกของโคก่าแพงแสน

เมื่อนำค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และ ค่ากิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคก่าแพงแสนมาวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์โดยใช้ Pearson Correlation พบว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีน และค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคก่าแพงแสนมีความสัมพันธ์ในทางบวก ทั้งสามค่า โดยค่าแรงตัดผ่านเนื้อและค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีนคาลปาสเตตินมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงว่าถ้าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่ามากค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์คาลปาสเตตินก็มากด้วย

ตารางที่ 4.5 ค่าสหสัมพันธ์ของค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณการแสดงออกของยีนและค่ากิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์คาลปาสเตตินในกล้ามเนื้อสันนอกของโคก่าแพงแสน

	ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	ปริมาณการ แสดงออกของยีน	การทำงานของเอนไซม์
ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ	1.00000	0.04562	0.65533*
ปริมาณการ แสดงออกของยีน		1.00000	-0.17575
การทำงานของเอนไซม์			1.00000

\* = มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )